

Semmelweis Egyetem Fogorvostudományi Kar, Orálbiológiai Tanszék*
School of Medical Sciences, University of Manchester, Manchester, United Kingdom**
Department of Orofacial Sciences, University of California, San Francisco, San Francisco, California, USA***

A pH-ciklizálás jelentősége az amelogenesisben

DR. RÁCZ RÓBERT*, DR. MARTIN C. STEWARD***, DR. PAMELA DENBESTEN***,
DR. VARGA GÁBOR*, DR. KERÉMI BEÁTA*

A zománcérés folyamatai hisztomorfológiai szinten jól ismertek, de a kristályképződés szabályozása, a háttérben álló molekuláris mechanizmusok még jórészt ismeretlenek. A szájüregi hámból származó ameloblast sejtek irányítják a zománcérést. A mátrixfehérjék szekrécióján és a zománcalkotó ásványi anyagok transzportján kívül a pH-szabályozásnak központi jelentősége van a zománcérésben, ugyanis a kristályképződés nagy mennyiségű H^+ felszabadulásával jár, amely semlegesítéséhez HCO_3^- szekréciója szükséges. Az érési fázis alatt kiemelt fontosságú a pH-ciklizálás jelensége, melynek során a szoros sejtkapcsolatok átrendeződése is megfigyelhető. A transzport- és szabályozó folyamatok genetikai vagy környezeti sérülése (pl. dentális fluorózis) a zománc hipomineralizációjához vezet. Ezen folyamatok felderítése céljából létrehoztunk egy funkcionális *in vitro* modellt. Ennek központi eleme, hogy permeábilis membránra ültetett, differenciált ameloblast eredetű sejtek az ameloblastokra jellemző fehérjemarkereket expresszálnak, szoros kapcsolatokat alakítanak ki, funkcionális szempontból polarizáltak, és vektorális HCO_3^- szekrécióra képesek. Saját kísérletes munkánk eredményei hozzájárulnak az ameloblast sejtek pH-ciklizálást elősegítő molekuláris mechanizmusának megértéséhez.

Kulcsszavak: zománcfejlődés, pH-szabályozás, ameloblast, bikarbonát,

Bevezetés

– A zománcképződés folyamatának főbb lépései

A zománcfejlődés sok tényező összehangolt működése által szigorúan szabályozott folyamat. Ennek eredményeként az emberi szervezet legjobban mineralizált, legnagyobb szervesen állománnyal rendelkező (95–96%) szövete alakul ki. Három fő fázisát különíthetjük el, ezek a preszekretoros, szekretoros és érési fázis [31, 40, 56]. A zománcképzésben az epithelialis eredetű ameloblastok vesznek részt, amelyek a teljes fejlődési folyamat során a funkciójukkal szoros összefüggésben, egymást váltva, különböző morfológiai alakokban jelennek meg.

A preszekretoros fázisban az ameloblastok a fogcsíra zománcszervének ektodermális eredetű belső zománchám sejtjeiből differenciálódnak. Közben polarizálttá válnak az egyes sejteket egymáshoz kapcsoló, ún. junctionális komplexek és a fehérjéket szintetizáló sejtalkotók megjelenésével [31].

A szekretoros ameloblastok magas, oszlopos sejtek, asszimmetrikus szerkezettel. A sejtmag és az energiaszolgáltató mitokondriumok a bazális póluson helyezkednek el, míg a fehérjeszintézisben szerepet játszó endoplazmás retikulum és a Golgi-apparátus az apikális, vagy más néven szekretoros póluson található meg. Ezenkívül az apikális póluson a sejt speciális nyúlványa, a Tomes-nyúlvány jelenik meg [28], amely fontos szerepet játszik a zománcprizmák

és az interprizmatikus állomány – kialakulásában [31]. A szekretoros fázisban a zománc teljes vastagsága kialakul, de az alapállomány még csak kis mértékben mineralizálódott (kb. 30%), a kristálycsíkok közötti terület egy később lebomló fehérje, az amelogenin tölti ki.

A maturációs, vagy más néven érési fázis megindulásakor az ameloblastok morfológiája megváltozik: magasságuk, fehérjeszintetizáló sejtorganelleik száma csökken, és a Tomes-nyúlvány is eltűnik [31]. Az érési fázisban a maturációs ameloblastok két formája egymásba többször is átalakul [11, 27]. Ezek a fodros felszínű (ruffle-ended) és a sima felszínű (smooth-ended) formák [55]. (1. kép) A fodros felszínű ameloblastok között a szoros sejtkapcsoló struktúrák (tight junction) az apikális pólusnál vannak jelen, elősegítve a jelentős endocitotikus aktivitást. (1. A kép) Ezzel szemben a sima felszínű ameloblastokban kisebb az endocitotikus aktivitás, az apikális szoros záródás pedig bazális irányba épül át. (1. B kép) Az érési fázisban egy adott időben a fodros felszínű sejtalkotók teszik ki az ameloblastok közel 70%-át, míg a sima felszínű formák mintegy 20%-ot [31]. A maturációs szakaszban az organikus állomány szinte teljes felszívódása megtörténik, és a kétféle sejtalkotó váltakozó megjelenésével, az ásványi alkotók intenzív transzportja és beépülése mellett a zománc kristályok vastagságbeli növekedésével a zománc eléri végleges kristályosodási (mineralizációs) fokát.

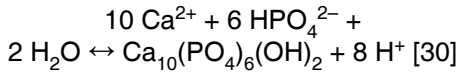
Érkezett: 2020. július 1.

Elfogadva: 2020. szeptember 17.

DOI <https://doi.org/10.33891/FSZ.114.2.74-82>

**pH-változás
az amelogenesis során
a mineralizációs térben**

A kristályképződés folyamán minden egységnyi hidroxipatit molekula képződése nyolc egység hidrogénion felszabadulással jár együtt, ami jelentősen csökkenti az extracelluláris pH-t [56]. A kémiai folyamat a következő:

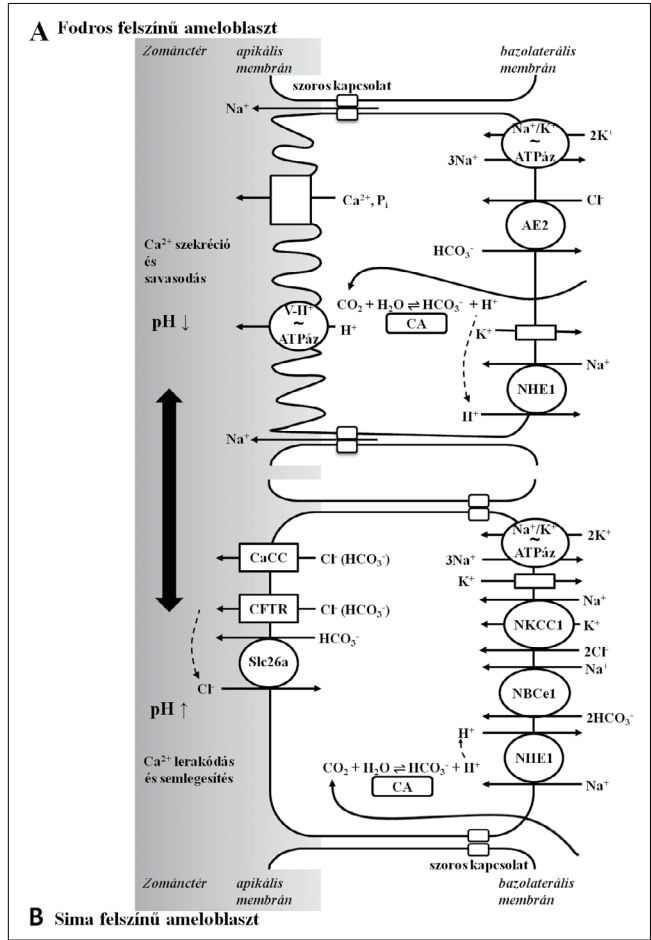


Az ilyen módon savassá váló környezet a kristályképződés gátlásához vezetne [27, 31, 36, 56, 66], ezért szükség van egy megfelelő pH-semlegesítő mechanizmusra. Számos munkacsoport vizsgálta a pH szabályozás jelentőségét [9, 24, 27, 57]. A szekretoros fázisban a mineralizációs térben a pH kb. 7,2. A maturációs fázisban az extracelluláris pH nagyobb változatosságot mutat, a semlegestől a gyengén savas pH között (6,2–7,2) változik [11]. (2. kép) Az érési fázis befejezéséhez közeledve a pH-érték emelkedése figyelhető meg [58]. A semleges, enyhén alkalikus extracelluláris pH a sima felszínű ameloblastok fázisára jellemző. Az ameloblastok nagyon pontosan kontrollálják az extracelluláris pH-t annak érdekében, hogy a további Ca^{2+} és PO_4^- ionok beépülése zavartalan legyen [31], de a szabályozás molekuláris mechanizmusa még nem teljes mértékben ismert.

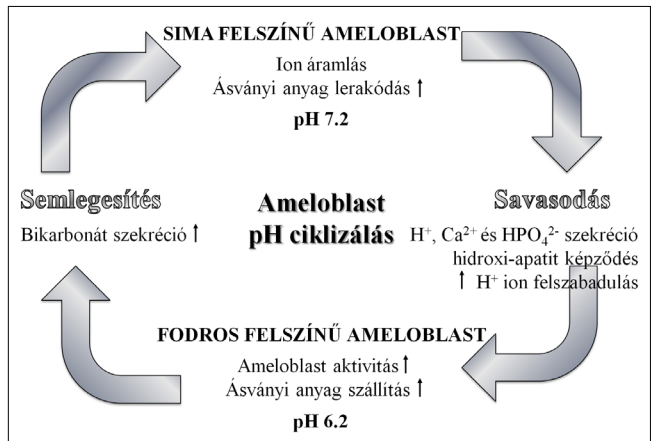
**Az ameloblast sejtek
transzportfolyamatai**

A zománcérés során a legfontosabb ásványok és mátrixfehérjék az ameloblastokon keresztül jutnak a zománc térbe: membráncsatornák és transzporter fehérjék közvetítésével, illetve a mátrix-proteinek szekréciója és lebontása, visszavétele az endoszomális/lizoszomális útvonalon keresztül történik.

Sok más szekréciós hámszövethez hasonlóan a paracelluláris utaknak is fontos élettani szerepe lehet az amelogenesis során. A paracelluláris transzport meghatározó struktúrái a szoros sejtkapcsolatok. Ezek azok a struktúrák a többi sejt-sejt kapcsolattípus közül, amelyek a legszorosabb kapcsolódást biztosítják a sejtek számára; mintegy „övszerűen” körbeveszik a sejteket, elzárva az egyrétegű zománchám epithelium apikális és bazolaterális oldalát egymástól. Ez a „gátrendszer” egyes ionok, molekulák koncentráció gradiens szerinti diffúzióját megengedi, másokét ugyanakkor nem. (1. A kép) Egyre több bizonyíték támasztja alá azt az elképzelést, miszerint ezek nem csupán passzív pórusok, hanem dinamikusan szabályozható struktúrák, egyfajta csatornaként működhetnek [60], így fontos összetevői lehetnek a transzportfolyamatok szabályozásának.



1. kép: Egyszerűsített modell a bikarbonát és elektrolit szekrécióról a fodros felszínű és a sima felszínű ameloblastokban



2. kép: pH ciklizálás az ameloblastokban a zománcépzés érési fázisában

Kalcium-transzport

A zománc szeretlen száraz tömegének többségét alkotó kalcium- és foszfátionok mineralizációs térbe jutása, azaz a papilláris sejtek által körbevett véretek felől történő, az ameloblast sejtréteg által végrehajtott transz-

celluláris transzport módja a mai napig nem teljesen ismert. A zománcérés során a sejteknek képesnek kell lenniük nagy mennyiségű Ca^{2+} és PO_4^{3-} ion szállítására, oly módon, hogy közben a Ca^{2+} koncentrációja nem növekedhet meg jelentősen a sejt belsejében. A Ca^{2+} megkötésére a citoszólban kelát-képző molekulák szolgálnak. Ilyenek a calmodulin, parvalbumin, calretinin, calcineurin és kétfajta calbindin (9kDa, 28kDa) fehérje [43]. Az utóbbi évek eredményei emellett az intracelluláris raktárak (endoplazmatikus retikulum – ER, mitokondrium) kitüntetett szerepét látszanak igazolni. Lacruz és mtsai kutatásai [41, 42, 44] megerősítették, hogy az ún. „store-operated calcium entry” (SOCE) a fő Ca^{2+} felvételi mechanizmusa az érési fázisú ameloblast sejteknek (ebben a fázisban a legnagyobb mértékű a Ca^{2+} transzport és a mineralizáció).

A közelmúltban felmerült egy további, kináz funkcióval rendelkező divalens csatorna, a tranziens receptor potenciál melasztatin-7 kation csatorna (TRPM7) szerepe is a Ca^{2+} felvételében. Állatkísérletes modellben leírták, hogy a csatorna nem megfelelő működése egerekben súlyosan hipomineralizált zománc és csontdefektusok kialakulásához vezet, alacsonyabb fokú Ca^{2+} és magasabb Mg^{2+} tartalommal [39]. A TRPM7 csatorna zománcérésben játszott pontos szerepe még tisztázatlan.

A Ca^{2+} leadását szolgáló fő transzportmechanizmus az NCKX4 kálium-függő nátrium/kalcium cserélő (antiporter) fehérje lehet a zománcér felé [20]. Ezen kívül a kálium-független nátrium/kalcium-cserélő fehérjék (NCX1-3) és a plazmamembrán Ca^{2+} ATPáz (PMCA) szerepét is valószínűsítik ezekben a sejtekben a zománcérés különböző stádiumaiban [45, 72], bár még pontos sejten belüli lokalizációjuk nem tisztázott [64], és szerepük, jelentőségük is vita tárgya.

A bikarbonát mint puffer szerepe a szájüregben

Az élő szervezetekben a legfontosabb puffer rendszer a szénsav/bikarbonát-ion (azaz a $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$) rendszer. A savközbősítő szerepén túl, a bikarbonát részt vesz a mucin-molekulák szekréciójának és „kicsomagolásának” szabályozásában [50], valamint a szolubilis adenilát-cikláz (sAC) aktivitásának szabályozásában is [53], amely az intracelluláris ciklikus-AMP szint (cAMP) regulációján keresztül kulcsfontosságú szerepet játszik a különböző sejtfunkciók szabályozásában. A bikarbonát által szabályozott sAC fehérjét a sejtek egyik (indirekt) pH-szenzor molekulájának tartják, amely érzékeny a bikarbonát/ CO_2 -koncentráció lokális változásaira [67]. Végül érdemes megemlíteni a bikarbonát antimikrobiális tulajdonságait [19]. Egyes tüdőbetegségekben a légúti hámfelszín baktériumölő képessége NaHCO_3 beadásával javítható, ami arra utal, hogy a bikarbonát helyreállítja a pH-t és ennek következtében az antimikrobiális peptidok, mint a laktoferrin és a lizozim, aktivitását [49]. A bikarbonát közvetlen antimikrobiális aktivitását is megfigyelték már [15, 17].

A bikarbonát-transzport és a pH-szabályozás szerepe a zománcérés során

A sav/bázis egyensúly és annak szabályozása kitüntetett szerepet játszik a zománc hidroxipatit képződésében. A kristálynövekedés nagymértékben függ az extracelluláris folyadék ionösszetételétől és pH-jától, illetve ezek finoman összehangolt szabályozásától [63]. Az ameloblast sejteknek tehát képesnek kell lenniük mind a mineralizációs térben, mind intracellulárisan a sav/bázis egyensúly, a pH szigorú szabályozására. A hidroxipatit molekula képződése során minden mól hidroxipatit képződése nyolc mól proton felszabadulását eredményezi. Az amelogenesis érési szakaszában ezért a hidroxipatit képződése során nagy mennyiségű proton szabadul fel, ami rendkívüli mértékben savasítja a közeget. Ezért, megfelelő pH-szabályozás hiányában, a helyi savas körülmények egyértelműen megakadályoznák a kalcium és foszfát további precipitációját, amelynek következtében a mineralizációs folyamat leállna. Így a kristálynövekedés fenntartása érdekében ezeket a protonokat folyamatosan semlegesíteni kell, bikarbonát zománcérbe történő kiválasztásával [27, 31, 36, 56, 66]. (1. B kép)

A légző- és az emésztőrendszer minden szakaszán található pH-szabályozást és/vagy bikarbonát-szekréciót ellátó epithelialis eredetű sejtek. Ezek jól meghatározott, általában az Slc4, Slc12, Slc26, és ABC transzporter fehérjecsaldokból kikerülő ionszorongókat és transzporter membránfehérjéket működtetnek a H^+ és HCO_3^- ionok irányított „mozgatására”. Az utóbbi évtizedben több ilyen, a pH-szabályozásban potenciálisan szerepet játszó transzporter fehérjét mutattak ki ameloblast sejtekben is [30, 65].

A pH-szabályozás zománcéjlődésben játszott szerepének fontosságát mutatja, hogy számos esetben mutatták ki bizonyos zománcéjlődési zavarok háttérben egy-egy pH-szabályozásban érintett transzportfehérje mutációját [16, 68]. Emellett számos ilyen transzportfehérje jelentősége nyert igazolást génkiütéses egérmodellek immunhisztológiai vizsgálatai során. Így a CFTR klorid-csatorna [1, 3, 61, 69, 70], az anion-cserélő-2 (AE2) [36], az elektrogén $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ kotranszporter-1 (NBCe1) [32], a Na^+/H^+ cserélő-1 (NHE1), a szénsav-anhidráz 2 és 6 (CA2, CA6), a pendrin (SLC26A4), DRA (SLC26A3) és a Pat1 (SLC26A6) transzporter fehérjék [26, 71] jelenlétét mind kimutatták az ameloblast sejtek szekréciós és/vagy érési stádiumaiban. (1. kép) Ezen transzportfehérjék működési zavarai bizonyítottan károsítják a sima és fodros felszínű ameloblast egymásba alakulását, és befolyásolják a normális zománcérést [11, 27, 33, 34]. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a mineralizációs térben a pH-nak kiemelkedő szerepe van az ameloblast működés irányításában, amelynek során a sima felszínű sejtek fodros felszínű sejtekké alakulnak az érési szakaszban. Az ameloblast funkciók sérült, hibás szabályozása késleltetheti a mineralizációs

folyamat végbemenetelét, és a fog előtörése után sérülékeny, hipomineralizált zománcot eredményezhet.

A zománcképződés során a sav/bázis szabályozásra vonatkozó adatok még ellentmondásosak [6, 11, 29]. Nyilvánvaló azonban, hogy az ameloblastoknak megfelelő molekuláris apparátussal kell rendelkezniük a bikarbonát-ionok szekréciójához a zománc térbe, hogy semlegesíteni tudják a hidroxipatit-képződés során felszabadult protonokat [65].

A pH-szabályozásban potenciálisan fontos szerepet betöltő iontranszport mechanizmusok

Az AE2 és CFTR mellett az ameloblastok az extracelluláris és intracelluláris pH változásait az elektrogén $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ kotranszporter-1 (NBCe1), a Na^+/H^+ cserélő-1 (NHE1), a szénsav-anhidráz 2 és 6 (CA2, CA6), a pendrin (SLC26A4), DRA (SLC26A3) és Pat1 (SLC26A6) transzporter fehérjék által is szabályozzák [11, 26, 27, 31, 33, 34]. (1. kép)

A nátrium-bikarbonát kotranszporter (SLC4A4/NBCe1) a nátrium- és bikarbonát-ionok egyidejű, egyirányú, elektrogén, azaz töltésváltozással is járó transzportját valósítja meg, így számos szerv epithel sejteiben (pl. hasnyálmirigy duktusz vagy nyálmirigy acinus és duktusz sejtekben) ellátja a bikarbonát keringési oldalról történő felvételét. Az NBCe1 transzporter fehérjének fontos szerepe van a zománcérés során is. Defektusa a zománcfejlődés épségét súlyosan érinti mind egérben, mind emberben [21, 24, 32]. Paine és mtsai szekréciós ameloblastok basolateralis membránjában mutatták ki egerekben [46]. Lacruz és mtsai megfigyelték az NBCe1 transzporter expressziójának növekedését érési ameloblast sejtekben is [32]. (1. B kép)

Az anion-cserélők elengedhetetlen szerepére is vannak bizonyítékaink. Köztük a legtöbb adat a klorid-bikarbonát cserélő SLC4A2/AE2 transzporterről áll rendelkezésre. Ezek a klorid- és bikarbonát-ionok ellentétes irányú transzportját végzik, és a legtöbb epithelsejt véroldali, azaz bazolateralis membránjában kifejeződnek. Az AE2 transzporter defektusa súlyos zománcszerkezeti és fogfejlődési rendellenességeket okoz, ahogy azt különböző génkiütéses egérmockok megfigyelték [10, 36]. Legnagyobb mértékben az érési ameloblastok bazolateralis membránjában jelenik meg [10, 27]. (1. B kép)

Az utóbbi években egy másik anion-cserélő fehérjecsald tagjainak zománcérésben játszott lehetséges szerepéről is felbukkantak adatok. Az SLC26A családba tartozó pendrin/SLC26A4, PAT1/SLC26A6 és SUT2/SLC26A7 transzporterek szintén a klorid- és bikarbonát-ionok cseréjét teszik lehetővé. (1. B kép) Ezeket is elsősorban érési fázisú ameloblastokban mutatták ki [71], de jelentőségük még nem világos, ugyanis az egyes transzporterek génkiütéses modelljei nem okoztak jelentős fenotípus-változást a zománcban [5, 26, 71]. Ennek oka az lehet, hogy ezek az anion-cse-

rélők kiegészítik egymást, képesek a másik funkciókiadását kompenzálni [26]. Az SLC26A1 és SLC26A7 hiányában az SLC26A9 és más transzporterek, ioncsatornák (CFTR, CA2, NBCe1) kifejeződése megnő [71]. Az SLC26A6 és SLC26A7 anion-cserélők hiánya állatokban a sav-bázis egyensúly súlyos szabályozási zavarát okozza [71]. Hasonló apikális eloszlást mutatnak, mint a CFTR, azaz a Cl^- és HCO_3^- transzportra egyaránt képes anion-csatorna. Ameloblastokban is valószínűleg a sejtek apikális pólusán vesznek részt a bikarbonát leadásában, szekréciójában, a CFTR csatornával együttműködve [5, 71].

A CFTR (cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor) egy ABC-transzporterek (ATP-kötő kazetta transzporterek) családjába tartozó, ciklikus-AMP (cAMP) által regulált klorid-csatorna. Az emberi szervezetben széleskörűen expresszálódik szekréciós epithel sejtek (pl. különböző mirigyhám sejtek) apikális membránjában. Mutációi a folyadék-transzport zavarához vezetnek, komoly betegséget okozva a tüdőben, a hasnyálmirigyben és más szervekben (cisztás fibrózis). A CFTR-csatorna immunhisztokémiai módszerrel kimutatható érési fázisú ameloblastok apikális membránjában [3], és a késői érési fázisban jelentősen emelkedett az expressziója a szekréciós fázishoz képest [34]. (1. B kép)

CFTR génkiütött (CF) egerekben a késői szekréciós, illetve a korai érési fázisú ameloblastok morfológiája megváltozik [69, 70]. A zománc normális vastagságú, de porózusabb és kevésbé mineralizált, továbbá a fogzománc Cl^- -tartalma alacsonyabb [1, 69]. A CFTR az ameloblastokban az apikális, azaz a mineralizációs oldalon fejeződik ki, a növekvő zománckristályok közvetlen közelében. Valószínűleg a klorid-ionok leadása a feladata [3], minden bizonnyal közvetlenül vagy közvetve bikarbonát-transzporttal kapcsolatos [23].

Funkcionális *in vitro* vizsgálatok a transzporterek szerepének igazolására

Az elmúlt években munkacsoportunk létrehozott az epithelialis transzportfolyamatok molekuláris szintű vizsgálatát lehetővé tévő kétdimenziós *in vitro* modellt. Ennek központi eleme a permeábilis membránra ültetett, differenciáltatott HAT-7 sejtek, amely egy patkány-metszőfogból izolált preameloblast eredetű sejt vonal. A Transwell membrán a tápfolyadék ion és fehérje alkotóit átengedi, de a sejteket nem. A membránon növesztett HAT-7 sejtekből szoros kapcsolatokkal zárt sejtréteget tudunk létrehozni. A sejtréteg két oldalán így két elkülönült (apikális és bazolateralis) térép alakul ki, amely térépek között az ionok számára csak a sejtrétegen keresztül lehetséges „átjárás”, és ionmozgás csak a fehérjék által szabályozottan tud megvalósulni. A sejteket egy pH-érzékeny fluorescens festékkel feltöltve (BCECF), majd a különböző térépeken különböző összetételű oldatokat áramoltatva egy speciális mikro-

szóppal, mikrofluorimetriás módszerrel valós időben követhetőek az intracelluláris pH-változások, azaz a H^+ és HCO_3^- ionok transzportja. 2016-ban publikált tanulmányunk fő megállapítása az volt, hogy a Transwell membránokon egy rétegben növesztett HAT-7 sejtek képesek az apikális-bazolaterális HCO_3^- szekrécióra [2]. A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy ebben a folyamatban milyen fehérjék játszanak szerepet. A bikarbonát szekréciójához szükség van előzetesen a HCO_3^- sejten belüli felhalmozására különböző transzportmechanizmusok útján. Az ebben feltehetően kulcsszerepet játszó bazolaterális oldali sav/bázis transzporterek azonosítása céljából először megvizsgáltuk a sejtekben az intracelluláris pH (pH_i) helyreállási képességét savas terhelés után, HCO_3^- -t és CO_2 -t nem tartalmazó környezetben.

A sejtek az intracelluláris pH-t szigorú keretek között szabályozzák, állandó értéken tartják, ezért a pH-szabályozásért felelős transzporterek vizsgálatához a pH-egyensúlyt drasztikusan megzavaró külső beavatkozásokat kell végeznünk. A leggyakoribb módszerek a jelentős intracelluláris savasodást/alkalizációt („savas terhelést”) okozó reagensek alkalmazása (pl. az ammónium-pulzus technika), és valamely, a transzportfolyamatok szempontjából fontos, meghatározó ion (pl. Na^+ , Cl^- , HCO_3^-) extracelluláris megvonása. Ez az érintett transzporterek működését megakadályozza, és az iontranszport irányát megváltoztatja.

Eredményeink szerint a savas terhelésre bekövetkező kompenzációs pH_i -emelkedés a bazolaterális Na^+ -tól függ. Így ezt nagy mértékben blokkolták a bazolaterálisan adott Na^+/H^+ cserélőket specifikusan gátló szerek [51]. Ez összhangban áll azzal a megfigyeléssel, hogy a gyomor-bél traktus különféle hámsejtjeinek szinte egyetemes tulajdonsága egy bazolaterálisan megjelenő Na^+/H^+ cserélő, az NHE1. (1. A és B kép)

A HAT-7 sejtés vizsgálatainkban a bazolaterális $Na^+-HCO_3^-$ -kotranszporter jelenlétét HCO_3^-/CO_2 jelenlétében végzett savas terhelés kísérletekben mutattuk ki [51]. A Na^+/H^+ cserélő és a Na^+/HCO_3^- kotranszporter gátlószereinek, egyidejű alkalmazása szignifikánsan nagyobb gátlást eredményezett, mint a Na^+/H^+ cserélő gátlószere önmagában alkalmazva. Ez arra utal, hogy egy bazolaterális nátrium-bikarbonát-kotranszporter is hozzájárul az intracelluláris HCO_3^- utánpótláshoz [51]. (1. B kép)

Amikor az NHE aktivitást HCO_3^- -mentes közegben mértük, a pH_i -visszatérés sebessége az acidózisból és annak NHE-inhibitorral való gátlása lényegesen alacsonyabb volt, mint a HCO_3^- -tartalmú közegben mért visszatérés és gátlása, újra jelezve egy NHE-független mechanizmus létezését [51].

A nátrium-kálium-klorid kotranszporter (NKCC) aktivitás is kimutatható mikrofluorometriával, NH_4Cl tartalmú oldat alkalmazásával. A nátrium-kálium-klorid kotranszporter a K^+ helyett NH_4^+ -ionokat is képes bejuttatni a sejtbe [48]. A gyengén savas NH_4^+ ionok mozgása pH-változást okoz, mivel a sejtbe jutva proton donorként

viselkedik, s ez pH-csökkenést okoz a sejtben. Kísérleteink során a polarizált HAT-7 sejtek NH_4Cl expozíciója alatt egy szignifikáns bazolaterális, az NKCC gátlószereire érzékeny pH_i csökkenést figyeltünk meg [51]. (1. B kép)

Cl^- ion szubsztitúciós kísérleteink szerint a HAT-7 sejtek bazolaterális membránjában funkcionális Cl^-/HCO_3^- -cserélő aktivitás detektálható [51]. Ez az ioncserélő valószínűleg az AE2 transzporter, amelynek expresszióját polarizált HAT-7 sejteinkben immunocitokémiával is kimutattuk [2]. Ez a transzporter a legtöbb epithelialis sejt bazolaterális membránjában is jelen van [54]. (1. A kép)

Az ameloblastok pH-szabályozásában szerepet játszó fő iontranszport-folyamatok feltételezett rendszere

A CO_2/HCO_3^- egyensúly fenntartásáért felelős transzportfehérjéknek központi szerepe van az ameloblast sejtek egy nagyon fontos funkciójában: nevezetesen abban, hogy az extracelluláris pH-t a mineralizációs térben megfelelően szabályozzák [9, 31, 33, 34]. Fiziológiás körülmények között, HCO_3^- és CO_2 jelenlétében, az NHE1 transzporter hozzájárul a bikarbonát felhalmozódásához a sejtekben, mivel elmozdítja a szénsav-anhidrázok által katalizált reakciót a HCO_3^- -ionok képződése felé azáltal, hogy a H^+ -ionokat eltávolítja a sejtől [51]. A H^+ leadás mechanizmusa mellett a $Na^+-HCO_3^-$ -kotranszporterek (NBC-k) szintén hozzájárulnak a HCO_3^- sejten belüli felhalmozódásához a HCO_3^- közvetlen felvételével. (1. kép) Ezt támasztják alá a HAT-7 sejtekben végzett RT-PCR-vizsgálataink eredményei az NBCe1 expressziójára vonatkozóan [2] és a szakirodalomban megjelent, az érési fázisú ameloblast sejtekre vonatkozó immunhisztokémiai adatok is [26]. Az NBCe1 bazolaterális lokalizációja ezekben az ameloblast sejtekben hasonló a patkány [73] és tengerimalac hasnyálmirigy-ductusz sejtekben [22], valamint patkány [18] és tengerimalac nyálmirigyek szekréciós hámsejtjeiben leírtakhoz [35]. (1. B kép)

Szekréciós hámokban a HCO_3^- transzport folyamatok végrehajtásához általában a klorid-ionok megfelelő transzportjára is szükség van [12]. Ezek a zománc képződés során is hasonlóan fontos szerepet játszanak; minden jel szerint nélkülözhetetlenek a pH-szabályozásában is [4]. Állatkísérletekben erős, pozitív korrelációt figyeltek meg a zománc alapállományának kalcium- és a klorid-tartalom változásai között, a zománcérés és az érési ameloblastok két formájának ciklikus egymásba alakulása során. A normál értéknél alacsonyabb Cl^- tartalom hipomineralizációhoz vezetett [8]. Az a megfigyelés is sokatmondó, hogy a CFTR-hiányos és az AE2-hiányos egerek fogainak zománcszerkezetében jelentős hipomineralizációs elváltozások figyelhetők meg [8, 61].

Lényeges körülmény, hogy a Cl^- ionoknak először intracellulárisan kell felhalmozódnuk a sejtekben, annak

érdekében, hogy az apikális membránon keresztül szekretálódhassanak. A Cl^- ionok felvételét biztosítani képes transzportfehérjék a *nátrium-kálium-klorid kotranszporterek* (NKCC-k). Az NKCC-k olyan egyirányú transzporterek, amelyek a Na^+ , K^+ és Cl^- ionokat egyidejűleg a sejtbe juttatják szekunder aktív transzport útján. (1. B kép) Ezért az NKCC1 transzporter feltehetően fontos szerepet játszik az ameloblast sejtek bazolaterális oldali Cl^- felvételében, hasonlóan számos más szekréciós epitheliumban leírtakhoz is [12, 62], [13], ahol a Cl^- -szekréció nagyban függ a bazolaterális NKCC1 aktivitástól [38, 47]. Mi szolgáltatunk az első funkcionális bizonyítékot arra, hogy az NKCC1 szerepet játszhat az ameloblastok Cl^- akkumulációjában. Ez azzal az új immunhisztokémiai megfigyeléssel is összecseng, mely szerint az ameloblastok működését közvetlenül támogató papilláris sejtekben is kifejeződik az NKCC1 az amelogenesis során [25].

A bikarbonát transzporterek másik fő csoportja az *anion-cserélők* (AE). Az Slc4 fehérjecsald Na^+ -független anion-cserélő tagjai a Cl^- és HCO_3^- ionok cseréjét valósítják meg a sejt belseje és extracelluláris tér között. (1. A kép) A nyálmirigy acinus sejtekben például a bazolaterális $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő az iontranszportmechanizmusok egy lényeges eleme, amely egy fontos útvonalat biztosít a Cl^- ionok gradienssel szemben történő intracelluláris felhalmozódásához [13, 38]. Az AE transzporterek bazolaterális elhelyezkedése az ameloblast eredetű HAT-7 sejtekben összhangban áll a korábbi irodalmi adatokkal is, amelyek immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutatták az AE2 bazolaterális jelenlétét érési ameloblast sejtekben [36, 37].

Fentiekre alapozva és saját funkcionális eredményeinkre is támaszkodva feltételezzük, hogy az érési ameloblastok ciklizálása során a következő folyamatok zajlanak le:

A fodros felszínű ameloblast sejtek szekretálják a Ca^{2+} és foszfát ionokat a zománctérbe. A sejt Ca^{2+} felvétele a bazolaterális oldalon történik, a *store operated calcium* felvételi útvonalon (SOCE) keresztül, majd a Ca^{2+} az apikális felszínen a kálium-függő nátrium/kalcium cserélő (NCKX4) és nátrium/kalcium cserélő (NCX, transzporterek) segítségével ürül ki. A foszfát szállítás valószínűleg a Na^+ -függő foszfáttranszporterén keresztül történik. Eközben a mineralizáció fokozódásával párhuzamosan, a mineralizációs térben a pH lassú csökkenése figyelhető meg, mivel a hidroxipatit kristályok képződése közben nagy mennyiségű proton szabadul fel (1 mól kristályképződés során 8 mól proton felszabadulás történik), amelyhez feltételezhetően egy aktív folyamat is hozzájárul, amelyben a V-H⁺-ATPáz (V típusú, vagy vakuoláris ATPáz) játszik szerepet az apikális oldalon [52]. (1. A kép)

A sima felszínű érési ameloblastok a bazolaterális oldalra építik át a szoros kapcsolatokat. (1. B kép) Az intracelluláris bikarbonát felhalmozódását a bazolaterálisan zajló $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotranszport és a Na^+/H^+ cserélőn keresztül megvalósuló, szénsav-anhidrázzal támogatott

proton-kiválasztás idézi elő [52]. (1. B kép) A Na^+ jelenlététől függő nátrium-proton cserélők a protonok bazolaterális oldali leadásával a bikarbonát intracelluláris akkumulációját biztosíthatják. (1. B kép) A nátrium-bikarbonát kotranszporter bazolaterális aktivitása a bikarbonát-ionok közvetlen transzportjához járulhat hozzá. A bazolaterális anion-cserélő aktivitás pedig fontos eleme lehet az ameloblast sejtek pH-szabályozásának mind a sejtben belül, mind a mineralizációs térben.

Az intracelluláris Cl^- felhalmozódást valószínűleg a nátrium-kálium-klorid kotranszporter végzi, amelynek fő mozgatója a Na^+/K^+ ATPáz generálta Na^+ gradiens. (1. B kép) Apikálisan a klorid és kisebb mennyiségben a bikarbonát a cAMP-aktiválta CFTR és a Ca^{2+} -aktivált klorid csatornákon keresztül hagyja el az ameloblast sejteket. (1. B kép) A bikarbonát apikálisan az ezt megelőzően szekretált kloridionnal cserélődik ki az SLC26A anioncserélő segítségével [52]. (1. B kép)

A ciklikus átalakulás a fodros felszínűből a sima felszínű sejtalakba és a pH-szabályozás képessége a mineralizációs térben együttesen lehetővé teszik a folyamatos hidroxipatit kristálynövekedést, amíg az eléri a legvégső, 95% feletti mineralizáltságú szintet [52]. (2. kép)

Nátrium-fluorid hatása a bikarbonát-szekrécióra

A fenti iontranszport-vizsgálatokhoz kapcsolódnak a fluorid zománcképződést befolyásoló mechanizmusával kapcsolatos megfigyeléseink. Jól ismert jelenség, hogy a nagy dózisu fluorid-expozíció a fogfejlődés során gátolja a zománcképződést, és hipomineralizált zománc kialakulásához vezet [7, 14, 59]. A pontos mechanizmus nagyrészt még ismeretlen, valószínűleg a dózistól és az ameloblastok érési stádiumától függően egyszerre több tényező is hozzájárulhat a jelenség kialakulásához. Így a fluorid befolyásolhatja az ameloblast sejtek ionszekrécióját, de az ameloblastok különböző fejlődési és funkcionális állapotait is, amelyek nincsenek közvetlen összefüggésben az ionszekrécióval. Emellett a fluorid közvetlenül is hatással lehet a mineralizáció egyes fizikai történéseire.

Saját kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a fluorid-expozíció befolyásolja-e a HAT-7 sejtek transzcelluláris HCO_3^- szekrécióját. Korábbi közleményünkben [2] kimutattuk, hogy a HAT-7 sejtek képesek HCO_3^- ionokat felvenni a bazolaterális membránon keresztül, majd ezután apikálisan szekretálni. Vizsgálati adataink egyértelműen azt mutatják, hogy a fluorid akut expozíciója egy széles koncentráció-tartományban nem okoz változást a HAT-7 sejtek HCO_3^- felvétel blokkolásával kiváltott acidifikációjának sebességében, ugyanakkor NaF adása lassítja a sejtek polarizációjához szükséges szoros kapcsolat kialakulását, mindezt olyan dózisokban, amelyek nem citotoxikusak az ameloblast eredetű HAT-7 sejtekre [51, 65].

Következtetés

A pH-szabályozás fontos az ameloblastok zománcképző működése során, ez összhangban áll saját vizsgálati eredményeinkkel is. Az amelogenezis érési szakaszában a hidroxipatit képződése nagy mennyiségű proton felszabadulásával jár együtt, ezért a megfelelő pH-szabályozás hiányában az így savassá váló környezet megakadályozza a kalcium és foszfát ionok további lerakódását, ezzel a mineralizációs folyamat leállítását okozza. Következésképp a kristálynövekedés fenntartása érdekében ezeket a protonokat semlegesíteni kell bázikus ionok, elsősorban bikarbonát mineralizációs térbe történő kiválasztásával. Ennek megfelelően az ameloblastok befolyásolni tudják az extracelluláris és intracelluláris pH-változásait a $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ kotranszporter-1 (NBCe1), a Na^+/H^+ cserélő-1 (NHE1), az anion cserélő-2 (AE2), a CFTR, a szén-sav-anhidráz 2 és 6 (CA2, CA6), a pendrin (SLC26A4), DRP (SLC26A3) és Pat1 (SLC26A6) transzporter fehérjék expresszióján és működésén keresztül.

Irodalom

- ARQUITT CK, BOYD C, WRIGHT JT: Cystic fibrosis transmembrane regulator gene (cfr) is associated with abnormal enamel formation. *J Dent Res* 2002; 81: 492–496. <https://doi.org/10.1177/154405910208100712>
- BORI E, GUO J, RACZ R, BURGHARDT B, FOLDES A, KEREMI B, et al: Evidence for bicarbonate secretion by ameloblasts in a novel cellular model. *J Dent Res* 2016; 95: 588–596. <https://doi.org/10.1177/0022034515625939>
- BRONCKERS A, KALOGERAKI L, JORNA HJ, WILKE M, BERVOETS TJ, LYARUU DM, et al: The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (cfr) is expressed in maturation stage ameloblasts, odontoblasts and bone cells. *Bone* 2010; 46: 1188–1196. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.12.002>
- BRONCKERS AL: Ion transport by ameloblasts during amelogenesis. *J Dent Res* 2017; 96: 243–253. <https://doi.org/10.1177/0022034516681768>
- BRONCKERS AL, GUO J, ZANDIEH-DOULABI B, BERVOETS TJ, LYARUU DM, LI X, et al: Developmental expression of solute carrier family 26a member 4 (slc26a4/pendrin) during amelogenesis in developing rodent teeth. *Eur J Oral Sci* 2011; 119 (Suppl 1): 185–192. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2011.00901.x>
- BRONCKERS AL, LYARUU DM, BERVOETS TJ, MEDINA JF, DENBESTEN P, RICHTER J, et al: Murine ameloblasts are immunonegative for tcirg1, the v-h-atpase subunit essential for the osteoclast plasma proton pump. *Bone* 2012; 50: 901–908. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.12.019>
- BRONCKERS AL, LYARUU DM, DENBESTEN PK: The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis. *J Dent Res* 2009; 88: 877–893. <https://doi.org/10.1177/0022034509343280>
- BRONCKERS AL, LYARUU DM, GUO J, BIJVELDS MJ, BERVOETS TJ, ZANDIEH-DOULABI B, et al: Composition of mineralizing incisor enamel in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice. *Eur J Oral Sci* 2015; 123: 9–16. <https://doi.org/10.1111/eos.12163>
- BRONCKERS AL, LYARUU DM, JALALI R, DENBESTEN PK: Buffering of protons released by mineral formation during amelogenesis in mice. *Eur J Oral Sci* 2016; 124: 415–425. <https://doi.org/10.1111/eos.12287>
- BRONCKERS AL, LYARUU DM, JANSEN ID, MEDINA JF, KELLOKUMPU S, HOEBEN KA, et al: Localization and function of the anion exchanger ae2 in developing teeth and orofacial bone in rodents. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2009; 312B: 375–387. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21267>
- DAMKIER HH, JOSEPHSEN K, TAKANO Y, ZAHN D, FEJERSKOV O, FRISCHE S: Fluctuations in surface pH of maturing rat incisor enamel are a result of cycles of H(+)-secretion by ameloblasts and variations in enamel buffer characteristics. *Bone* 2014; 60: 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.12.018>
- DEMETER I, HEGYESI O, NAGY AK, CASE MR, STEWARD MC, VARGA G, et al: Bicarbonate transport by the human pancreatic ductal cell line hpaf. *Pancreas* 2009; 38: 913–920. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3181b32c08>
- DEMETER I, SZÜCS A, HEGYESI O, FÖLDES A, RÁCZ GZ, BURGHARDT B, et al: Vectorial bicarbonate transport by par-c10 salivary cells. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60 Suppl 7: 197–204.
- DENBESTEN PK, CRENSHAW MA, WILSON MH: Changes in the fluoride-induced modulation of maturation stage ameloblasts of rats. *J Dent Res* 1985; 64: 1365–1370. <https://doi.org/10.1177/00220345850640120701>
- DOBAY O, LAUB K, STERCZ B, KERI A, BALAZS B, TOTHPAL A, et al: Bicarbonate inhibits bacterial growth and biofilm formation of prevalent cystic fibrosis pathogens. *Front Microbiol* 2018; 9: 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02245>
- DUAN X: Ion channels, channelopathies, and tooth formation. *J Dent Res* 2014; 93: 117–125. <https://doi.org/10.1177/0022034513507066>
- GAWANDE PV, LOVETRI K, YAKANDAWALA N, ROMEO T, ZHANEL GG, CVITKOVITCH DG, et al: Antibiofilm activity of sodium bicarbonate, sodium metaperiodate and sds combination against dental unit waterline-associated bacteria and yeast. *J Appl Microbiol* 2008; 105: 986–992. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03823.x>
- GRESZ V, KWON TH, VORUM H, ZELLES T, KURTZ I, STEWARD MC, et al: Immunolocalization of electroneutral na(+)-hco cotransporters in human and rat salivary glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G473–480. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00421.2001>
- GUTIERREZ-HUANTE M, MARTINEZ H, BUSTAMANTE VH, PUENTE JL, SANCHEZ J: Bicarbonate enhances the in vitro antibiotic activity of kanamycin in escherichia coli. *Lett Appl Microbiol* 2015; 60: 440–446. <https://doi.org/10.1111/lam.12388>
- HU P, LACRUZ RS, SMITH CE, SMITH SM, KURTZ I, PAINE ML: Expression of the sodium/calcium/potassium exchanger, nckx4, in ameloblasts. *Cells Tissues Organs* 2012; 196: 501–509. <https://doi.org/10.1159/000337493>
- INATOMI J, HORITA S, BRAVERMAN N, SEKINE T, YAMADA H, SUZUKI Y, et al: Mutational and functional analysis of slc4a4 in a patient with proximal renal tubular acidosis. *Pflugers Arch* 2004; 448: 438–444. <https://doi.org/10.1007/s00424-004-1278-1>
- ISHIGURO H, NARUSE S, KITAGAWA M, SUZUKI A, YAMAMOTO A, HAYAKAWA T, et al: CO2 permeability and bicarbonate transport in microperfused interlobular ducts isolated from guinea-pig pancreas. *J Physiol* 2000; 528 (Pt 2): 305–315. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00305.x>
- ISHIGURO H, STEWARD MC, NARUSE S, KO SB, GOTO H, CASE RM, et al: Cfr functions as a bicarbonate channel in pancreatic duct cells. *J Gen Physiol* 2009; 133: 315–326. <https://doi.org/10.1085/jgp.200810122>
- JALALI R, GUO J, ZANDIEH-DOULABI B, BERVOETS TJ, PAINE ML, BORON WF, et al: Nbce1 (slc4a4) a potential ph regulator in enamel organ cells during enamel development in the mouse. *Cell Tissue Res* 2014; 358: 433–442. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1935-4>
- JALALI R, LODDER JC, ZANDIEH-DOULABI B, MICHA D, MELVIN JE, CATALAN MA, et al: The role of na:K:2cl cotransporter 1

- (nkc1/slc12a2) in dental epithelium during enamel formation in mice. *Front Physiol* 2017; 8: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00924>
26. JALALI R, ZANDIEH-DOULABI B, DENBESTEN PK, SEIDLER U, RIEDERER B, WEDENOJA S, et al: Slc26a3/dra and slc26a6 in murine ameloblasts. *J Dent Res* 2015; 94: 1732–1739. <https://doi.org/10.1177/0022034515606873>
 27. JOSEPHSEN K, TAKANO Y, FRISCHE S, PRAETORIUS J, NIELSEN S, AOBA T, et al: Ion transporters in secretory and cyclically modulating ameloblasts: A new hypothesis for cellular control of preeruptive enamel maturation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299: C1299–307. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00218.2010>
 28. KALLENBACH E: Fine structure of the stratum intermedium, stellate reticulum, and outer enamel epithelium in the enamel organ of the kitten. *J Anat* 1978; 126: 247–260.
 29. LACRUZ RS, BROOKES SJ, WEN X, JIMENEZ JM, VIKMAN S, HU P, et al: Adaptor protein complex 2-mediated, clathrin-dependent endocytosis, and related gene activities, are a prominent feature during maturation stage amelogenesis. *J Bone Miner Res* 2013; 28: 672–687. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1779>
 30. LACRUZ RS, HABELITZ S, WRIGHT JT, PAINE ML: Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiol Rev* 2017; 97: 939–993. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2016>
 31. LACRUZ RS, NANJI A, KURTZ I, WRIGHT JT, PAINE ML: Regulation of pH during amelogenesis. *Calcif Tissue Int* 2010; 86: 91–103. <https://doi.org/10.1007/s00223-009-9326-7>
 32. LACRUZ RS, NANJI A, WHITE SN, WEN X, WANG H, ZALZAL SF, et al: The sodium bicarbonate cotransporter (nbce1) is essential for normal development of mouse dentition. *J Biol Chem* 2010; 285: 24432–24438. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.115188>
 33. LACRUZ RS, SMITH CE, KURTZ I, HUBBARD MJ, PAINE ML: New paradigms on the transport functions of maturation-stage ameloblasts. *J Dent Res* 2013; 92: 122–129. <https://doi.org/10.1177/0022034512470954>
 34. LACRUZ RS, SMITH CE, MOFFATT P, CHANG EH, BROMAGE TG, BRINGAS P JR, et al: Requirements for ion and solute transport, and pH regulation during enamel maturation. *J Cell Physiol* 2012; 227: 1776–1785. <https://doi.org/10.1002/jcp.22911>
 35. LI J, KOO NY, CHO IH, KWON TH, CHOI SY, LEE SJ, et al: Expression of the na⁺-hco₃⁻ cotransporter and its role in pH regulation in guinea pig salivary glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G1031–1040. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00483.2005>
 36. LYARUU DM, BRONCKERS AL, MULDER L, MARDONES P, MEDINA JF, KELLOKUMPU S, et al: The anion exchanger ae2 is required for enamel maturation in mouse teeth. *Matrix Biol* 2008; 27: 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2007.09.006>
 37. LYARUU DM, MEDINA JF, SARVIDE S, BERVOETS TJ, EVERTS V, DENBESTEN P, et al: Barrier formation: Potential molecular mechanism of enamel fluorosis. *J Dent Res* 2014; 93: 96–102. <https://doi.org/10.1177/0022034513510944>
 38. MELVIN JE, YULE D, SHUTTLEWORTH T, BEGENISICH T: Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annu Rev Physiol* 2005; 67: 445–469. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.041703.084745>
 39. NAKANO Y, LE MH, ABDUWELI D, HO SP, RYAZANOVA LV, HU Z, et al: A critical role of trpm7 as an ion channel protein in mediating the mineralization of the craniofacial hard tissues. *Front Physiol* 2016; 7: 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00258>
 40. NANJI A: Ten cate's oral histology: Development, structure, and function. *Elsevier, St. Louis, Missouri* 2018.
 41. NURBAEVA MK, ECKSTEIN M, CONCEPCION AR, SMITH CE, SRIKANTH S, PAINE ML, et al: Dental enamel cells express functional soce channels. *Sci Rep* 2015; 5: 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep15803>
 42. NURBAEVA MK, ECKSTEIN M, DEVOTTA A, SAINT-JEANNET JP, YULE DI, HUBBARD MJ, et al: Evidence that calcium entry into calcium-transporting dental enamel cells is regulated by cholecystokinin, acetylcholine and atp. *Front Physiol* 2018; 9: 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00801>
 43. NURBAEVA MK, ECKSTEIN M, FESKE S, LACRUZ RS: Ca(2+) transport and signalling in enamel cells. *J Physiol* 2017; 595: 3015–3039. <https://doi.org/10.1113/JP272775>
 44. NURBAEVA MK, ECKSTEIN M, SNEAD ML, FESKE S, LACRUZ RS: Store-operated ca²⁺ entry modulates the expression of enamel genes. *J Dent Res* 2015; 94: 1471–1477. <https://doi.org/10.1177/0022034515598144>
 45. OKUMURA R, SHIBUKAWA Y, MURAMATSU T, HASHIMOTO S, NAKAGAWA K, TAZAKI M, et al: Sodium-calcium exchangers in rat ameloblasts. *J Pharmacol Sci* 2010; 112: 223–230. <https://doi.org/10.1254/jphs.09267FP>
 46. PAINE ML, SNEAD ML, WANG HJ, ABULADZE N, PUSHKIN A, LIU W, et al: Role of nbce1 and ae2 in secretory ameloblasts. *J Dent Res* 2008; 87: 391–395. <https://doi.org/10.1177/154405910808700415>
 47. PAULAIS M, TURNER RJ: Activation of the na(+)-k(+)-2cl- cotransporter in rat parotid acinar cells by aluminum fluoride and phosphatase inhibitors. *J Biol Chem* 1992; 267: 21558–21563. <https://doi.org/10.1172/JCI115695>
 48. PAULAIS M, TURNER RJ: Beta-adrenergic upregulation of the na(+)-k(+)-2cl- cotransporter in rat parotid acinar cells. *J Clin Invest* 1992; 89: 1142–1147. <https://doi.org/10.1172/JCI115695>
 49. PEZZULO AA, TANG XX, HOEGGER MJ, ABOU ALAIWA MH, RAMACHANDRAN S, MONINGER TO, et al: Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* 2012; 487: 109–113. <https://doi.org/10.1038/nature11130>
 50. QUINTON PM: Role of epithelial HCO₃⁻ transport in mucin secretion: Lessons from cystic fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299: C1222–1233. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00362.2010>
 51. RÁCZ R, FOLDES A, BORI E, ZSEMBERY A, HARADA H, STEWARD MC, et al: No change in bicarbonate transport but tight-junction formation is delayed by fluoride in a novel ameloblast model. *Front Physiol* 2017; 8: 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00940>
 52. RÁCZ R, NAGY A, RAKONCZAY Z, DUNAVÁRI EK, GERBER G, VARGA G: Defense mechanisms against acid exposure by dental enamel formation, saliva and pancreatic juice production. *Curr Pharm Des* 2018; 24: 2012–2022. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180515125654>
 53. RAHMAN N, BUCK J, LEVIN LR: pH sensing via bicarbonate-regulated “soluble” adenylyl cyclase (sac). *Front Physiol* 2013; 4: 1–5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00343>
 54. ROMERO MF, FULTON CM, BORON WF: The SLC4 family of HCO₃⁻ transporters. *Pflugers Arch* 2004; 447: 495–509. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1180-2>
 55. SASAKI T: Morphology and function of maturation ameloblasts in kitten tooth germs. *J Anat* 1984; 138 (Pt 2): 333–342.
 56. SMITH CE: Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9: 128–161. <https://doi.org/10.1177/10454411980090020101>
 57. SMITH CE, ISSID M, MARGOLIS HC, MORENO EC: Developmental changes in the pH of enamel fluid and its effects on matrix-resident proteinases. *Adv Dent Res* 1996; 10: 159–169. <https://doi.org/10.1177/08959374960100020701>
 58. SMITH CE, NANJI A: Protein dynamics of amelogenesis. *Anat Rec* 1996; 245: 186–207. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199606\)245:2<186::AID-AR7>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199606)245:2<186::AID-AR7>3.0.CO;2-V)

59. SMITH CE, NANJI A, DENBESTEN PK: Effects of chronic fluoride exposure on morphometric parameters defining the stages of amelogenesis and ameloblast modulation in rat incisors. *Anat Rec* 1993; 237: 243–258. <https://doi.org/10.1002/ar.1092370212>
60. STEED E, BALDA MS, MATTER K: Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol* 2010; 20: 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.12.002>
61. SUI W, BOYD C, WRIGHT JT: Altered pH regulation during enamel development in the cystic fibrosis mouse incisor. *J Dent Res* 2003; 82: 388–392. <https://doi.org/10.1177/154405910308200512>
62. SZÜCS A, DEMETER I, BURGHARDT B, OVARI G, CASE RM, STEWARD MC, et al: Vectorial bicarbonate transport by capan-1 cells: A model for human pancreatic ductal secretion. *Cell Physiol Biochem* 2006; 18: 253–264. <https://doi.org/10.1159/000097672>
63. TAKAGI T, OGASAWARA T, TAGAMI J, AKAO M, KUBOKI Y, NAGAI N, et al: Ph and carbonate levels in developing enamel. *Connect Tissue Res* 1998; 38: 181–187; discussion 201–205. <https://doi.org/10.3109/03008209809017035>
64. TAKANO Y: Enamel mineralization and the role of ameloblasts in calcium transport. *Connect Tissue Res* 1995; 33: 127–137. <https://doi.org/10.3109/03008209509016992>
65. VARGA G, DENBESTEN P, RÁCZ R, ZSEMBERY A: Importance of bicarbonate transport in pH control during amelogenesis – need for functional studies. *Oral Dis* 2018; 24: 879–890. <https://doi.org/10.1111/odi.12738>
66. VARGA G, KERÉMI B, BORI E, FÖLDES A: Function and repair of dental enamel – potential role of epithelial transport processes of ameloblasts. *Pancreatology* 2015; 15: S55–60. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2015.01.012>
67. WIGGINS SV, STEEGBORN C, LEVIN LR, BUCK J: Pharmacological modulation of the $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-/\text{pH}$ -, calcium-, and ATP-sensing soluble adenylyl cyclase. *Pharmacol Ther* 2018; 190: 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.05.008>
68. WRIGHT JT, CARRION IA, MORRIS C: The molecular basis of hereditary enamel defects in humans. *J Dent Res* 2015; 94: 52–61. <https://doi.org/10.1177/0022034514556708>
69. WRIGHT JT, HALL KI, GRUBB BR: Enamel mineral composition of normal and cystic fibrosis transgenic mice. *Adv Dent Res* 1996; 10: 270–274; discussion 5. <https://doi.org/10.1177/08959374960100022501>
70. WRIGHT JT, KIEFER CL, HALL KI, GRUBB BR: Abnormal enamel development in a cystic fibrosis transgenic mouse model. *J Dent Res* 1996; 75: 966–973. <https://doi.org/10.1177/00220345960750041101>
71. YIN K, LEI Y, WEN X, LACRUZ RS, SOLEIMANI M, KURTZ I, et al: Slc26a gene family participate in pH regulation during enamel maturation. *PLoS One* 2015; 10: 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144703>
72. ZAKI AE, HAND AR, MEDNIEKS MI, EISENMANN DR, BORKE JL: Quantitative immunocytochemistry of Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase in ameloblasts associated with enamel secretion and maturation in the rat incisor. *Adv Dent Res* 1996; 10: 245–251. <https://doi.org/10.1177/08959374960100022101>
73. ZHAO H, STAR RA, MUALLEM S: Membrane localization of H^+ and HCO_3^- transporters in the rat pancreatic duct. *J Gen Physiol* 1994; 104: 57–85. <https://doi.org/10.1085/jgp.104.1.57>

Review

RÁCZ R, STEWARD CM, DENBESTEN P, VARGA G, KERÉMI B

Significance of pH cyclization in amelogenesis

The process of amelogenesis is well understood at the histomorphological level, but the regulation of crystal formation and the underlying molecular mechanisms are still largely unknown. Ameloblast cells derived from the oral epithelium regulate enamel maturation. In addition to the secretion of matrix proteins and the transport of minerals, pH regulation is also essential as the formation of hydroxyapatite crystals generates large quantities of H^+ ions, which must be neutralized by the secretion of HCO_3^- . During the maturation phase, the phenomenon of pH cycling is of paramount importance, during which a rearrangement of tight-junctions can also be observed. Genetic or environmental impairment of transport and regulatory processes (e.g. dental fluorosis) leads to the development of enamel defects. To explore these processes, we have developed an *in vitro* model suitable for functional studies. Central elements of this model are that differentiated ameloblast-derived cells cultured on a permeable membrane express ameloblast-specific protein markers, form tight junctions, become functionally polarized, and are capable of vectorial HCO_3^- secretion. The results of our own experimental work contribute to a better understanding of the molecular mechanism of pH cycling of ameloblast cells.

Keywords: amelogenesis, ameloblast, dental enamel, bicarbonates, buffers, hydrogen-ion concentration (based on MeHS terms)